



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA**

**TÍTULO**

**Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con fluconazol, sobre *Cándida albicans* ATCC 10231**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO-CIRUJANO**

**AUTOR:**

**Marconi Alomia Dionicio Ramos  
(0000-0002-0869-118X)**

**ASESORES**

**Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez  
(0000-0002-6764-4068)**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

**Enfermedades Infecciosas y Transmisibles**

**Trujillo – Perú**

**2019**

**PÁGINA DEL JURADO**

**Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con  
fluconazol, sobre *Cándida albicans* ATCC 10231**

---

Dra. ANA MARÍA CHIAN GARCÍA  
PRESIDENTE DE JURADO

---

Dra. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ  
SECRETARIO DEL JURADO

---

Dra. IRMA LUZ YUPARI AZABACHE  
VOCAL DE JURADO

Trujillo, ..... Mayo de 2019

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a Zenaida, mi Madre; quién me brindo su amor y confianza en este camino lleno de retos y aprendizajes. A mi familia que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

Marconi Alomia Dionicio Ramos

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, por haberme dado la oportunidad de formarme en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo.

De manera especial a mi tutor de tesis, por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino a lo largo de mi carrera universitaria y haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

A la Universidad César Vallejo, por haberme brindado tantas oportunidades y enriquecerme en conocimiento.

Marconi Alomia Dionicio Ramos

## DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **MARCONI ALOMIA DIONICIO RAMOS** con **DNI 45237360**, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: **“Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con fluconazol, sobre *Candida albicans* ATCC 10231”**, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, Mayo de 2019.

Marconi Alomia Dionicio Ramos

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: **“Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con fluconazol, sobre *Candida albicans* ATCC 10231”**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

El Autor.

Marconi Alomia Dionicio Ramos

## ÍNDICE

### **PÁGINAS PRELIMINARES**

Página del Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Declaratoria de autenticidad	v
Presentación	vi
Índice	vii

### **RESUMEN**

viii

### **ABSTRACT**

### **I. INTRODUCCIÓN**

1

1.1. Problema	8
1.2. Hipótesis	8
1.2. Objetivos	9

### **II. MARCO METODOLÓGICO**

10

2.1. Variables	10
2.2. Operacionalización de variables	10
2.3. Metodología	10
2.4. Tipos de estudio	11
2.5. Diseño	11
2.6. Población, muestra y muestreo	11
2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	18
2.8. Métodos de análisis de datos	12
2.9. Aspectos éticos	13

### **III. RESULTADOS**

14

### **IV. DISCUSIÓN**

18

### **V. CONCLUSIONES**

21

### **VI. RECOMENDACIONES**

22

### **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

23

### **ANEXOS**

29

## RESUMEN

Se realizó un estudio experimental in vitro con el objetivo de determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol. Se evaluó el aceite esencial a 4 concentraciones (100, 75, 50 y 25%) mediante el método de disco difusión de Kirby-Bauer. Los resultados evidenciaron que el mayor diámetro de halo inhibitorio fue a la concentración de 100% (18 mm), considerándose a *Candida albicans* sensible, según los criterios del CLSI ( $\geq 17$ ), DE:  $1.414 \pm 0.447$  IC95% [16.99-19.01]. Los diámetros de los halos de inhibición para las concentraciones de 75, 50 y 25% fueron menores, lo cual se considera que la levadura es resistente. Se concluye que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 100% es eficaz como antifúngico comparado con fluconazol a la concentración de 25 $\mu$ g, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, en estudio in vitro.

**Palabras clave:** *Eucalyptus globulus*, *Candida albicans*, actividad antifúngica.



## ABSTRACT

An in vitro experimental study was, carried out with the aim of determining the antifungal activity of the essential oil of *Eucalyptus globulus* on *Candida albicans* ATCC 10231 compared with fluconazole. The essential oil was evaluated at 4 concentrations (100, 75, 50 and 25%) by the Kirby-Bauer diffusion disc method. The results showed that the largest inhibitory halo diameter was at the concentration of 100% (18 mm), considering *Candida albicans* sensitive, according to the CLSI criteria ( $\geq 17$ ), DE:  $1.414 \pm 0.447$  IC95% [16.99-19.01]. The diameters of the inhibition rings for the concentrations of 75, 50 and 25% were lower, which is considered that the yeast is resistant. It is concluded that 100% *Eucalyptus globulus* essential oil is effective as an antifungal agent compared to fluconazole at the concentration of 25 $\mu$ g, on *Candida albicans* ATCC 10231, in vitro.

**Key words:** *Eucalyptus globulus*, *Candida albicans*, antifungal activity.

## I. INTRODUCCIÓN

Existen muchos microorganismos patógenos que ocasionan infecciones genitales en las mujeres, entre ellos tenemos a *Candida albicans*. Cada patógeno tiene sus propias características y provoca malestar y morbilidad considerable en mujeres, especialmente en edad fértil. La presencia de bacterias, hongos, virus y parásitos, se debe a diversos factores intrínsecos y extrínsecos; sin embargo, lo más común es la transmisión por contacto sexual.<sup>1</sup>

*Candida albicans* se encuentra en el tracto vaginal, de hecho, comprende entre el 85% a 95% de las levaduras aisladas de la vagina. El desarrollo de vulvovaginitis por *C. albicans* se considera un problema común de morbilidad entre las mujeres en los Estados Unidos de América con más de 10 millones de consultas ginecológicas al año. Se puede aislar de 20% a 30% de las mujeres no embarazadas en estudios transversales, y hasta en 70% en estudios longitudinales. Además, el acceso fácil a los medicamentos hace que un gran porcentaje de mujeres se automediquen con frecuencia, generando alto riesgo de resistencia antimicótica, especialmente a los azoles. Todo esto se ha convertido un problema serio para los EUA ya que le demanda un gasto de 1 billón de dólares por año.<sup>2</sup>

La forma clínica más severa ocasionada por este hongo es la candidemia. En Lima existe una incidencia de 1,18 casos de candidemia por cada 1000 hospitalizaciones y se ha encontrado 9% en catéteres venosos colocados en UCI. Desafortunadamente, no existen reportes claros ni precisos en las provincias del Perú, salvo el reportado en el Hospital Nacional Carlos Alberto de Arequipa, el cual indica que entre 2011 y 2014 se identificaron 77 casos de candidemia, siendo 46,5% ocasionados por *C. albicans*.<sup>3</sup>

Asimismo, esta levadura puede infectar la piel y la cavidad oral. Un estudio realizado en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” determinó que *C. albicans* fue el agente etiológico en el 15,3% de los casos de dermatomicosis en los últimos 30 años<sup>4</sup>. A nivel oral, la candidiasis presenta diferentes cuadros clínicos entre agudas y crónicas. Generalmente, la candidiasis oral es de etiología multifactorial que se trata en primera instancia con antimicóticos tópicos. Por ello, se puede utilizar formas alternativas con la medicina complementaria que utiliza plantas.<sup>5</sup>

En la actualidad, se toma cada vez más importancia a la medicina alternativa para varios tipos de afecciones infecciosas y no infecciosas. Los fitoconstituyentes de las plantas tienen actividad antimicrobiana, esto está comprobado por diversos estudios a nivel mundial. Cada vez se reportan más estudios sobre la susceptibilidad microbiana frente a extractos y aceites

esenciales de plantas, debido a que también existen más casos reportados de resistencia de microbiana a los fármacos. En una gran parte de la población y de la comunidad científica, todavía existen dudas acerca de la fitoterapia en muchos países. En el Perú, es usual la práctica en el tratamiento de muchas afecciones de salud.<sup>6</sup>

El eucalipto es una planta medicinal que es usado comúnmente para afecciones respiratorias en muchos lugares de Perú; sin embargo, también se le atribuye propiedades antimicóticas, especialmente en infecciones genitales, lo cual no está bien definida la dosificación y es materia de investigaciones en la actualidad. El aceite esencial de eucalipto es considerado eficaz contra *C. albicans*, según lo establecen algunos trabajos de investigación en nuestro país y en otros países.<sup>7</sup>

### **A continuación se presenta investigaciones previas**

**Nidhi P et al. (India, 2018)**, realizaron un estudio cuyo objetivo fue examinar los aceites esenciales (AE) de las hojas de *Eucalyptus globulus* y 3 plantas más, en busca de propiedades antimicrobianas (antifúngicas y antibacterianas) y antioxidantes. Los aceites los obtuvieron por hidrodestilación. Evaluaron la actividad antimicrobiana de los AE contra cepas de *Candida albicans* y 4 bacterias. El AE de *Eucalyptus globulus* mostró una actividad antifúngica más fuerte contra las cepas de *C. albicans*, con halos de inhibición entre  $17\pm0.75$  y  $21\pm1.02$  mm; además, fue eficaz contra las 4 bacterias. Concluyeron que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* es un antimicrobiano de amplio espectro, pero son terapias más efectivas contra los hongos unicelulares.<sup>8</sup>

**Tolba H et al. (Argelia, 2017)**, en su estudio evaluaron la composición química, el antioxidante y las actividades antimicrobianas del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* que crece en Argelia. La actividad antimicrobiana del aceite contra doce bacterias y dos levaduras la determinaron mediante el método de difusión en disco y el método de volatilización de disco. Observaron una mayor actividad antimicrobiana en la fase líquida. Encontraron que la zona de inhibición varía de 42 a  $55\pm2.82$  mm para *Candida albicans*. Concluyeron que el aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* que crece en Argelia tiene las propiedades antioxidantes y antimicrobianas.<sup>9</sup>

**Echevarría A. (Ecuador, 2017)**. Determinó la actividad antifúngica “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Eucalyptus globulus* “Eucalipto”. Para el aceite esencial utilizó las concentraciones de 12.500ppm (100%), 10.500ppm (84%), 8.500ppm (68%), 6.500ppm (52%), 4,500ppm (36%) y 2,500 (20%) sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Para dicho fin sembraron en agar Sabouroud utilizando el método de difusión en pocillos con las diferentes concentraciones, adicionalmente se usó como control positivo el Fluconazol. Realizó tres repeticiones de cada tratamiento para obtener una medida estándar. Obtuvo como resultados una actividad inhibitoria sobre *C. albicans* con el halo de inhibición más pequeño (10mm) en 4,500ppm y el más grande (17mm) en 12,500ppm, con una desviación estándar de 1 a 1,53. Concluye que el aceite esencial de *E. globulus* presenta efecto inhibitorio sobre el hongo *C. albicans*, de modo que puede ser utilizado como un agente en el control de candidiasis oral.<sup>10</sup>

**Mota V. et al (Brazil, 2015).** Evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y de las sustancias xilitol y papaína contra 5 bacterias y *Candida albicans*. La evaluación antimicrobiana in vitro se utilizó mediante la prueba de difusión en agar y la evaluación del diámetro de la zona de inhibición de las sustancias evaluadas. Se usó clorhexidina al 0,5% como control. La evaluación se repitió 3 veces. El aceite de *E. globulus* mostró igual inhibición cuando se aplicó a *C. albicans*., obteniendo un halo de inhibición de 50 mm. Concluyen que el aceite de *E. globulus* tiene actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos y parece ser una alternativa viable como agente germicida.<sup>11</sup>

**Emira N et al (Túnez, 2013),** hicieron un estudio y su objetivo fue evaluar el posible papel de los aceites esenciales de *M. alternifolia* y *E. globulus* en la inhibición de la formación de biopelículas de *Candida* en polimetilmetacrilato (PMMA). La actividad antifúngica de los aceites esenciales se probaron en dos aislados orales de *Candida* y dos cepas de tipo de referencia. Se valuó la susceptibilidad de *Candida* por el método de disco difusión y se halló la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC). Observaron que para *Eucalyptus globulus* se formó zonas de inhibición entre 17.66 y 19.33±0.57 mm. Concluyeron que los aceites esenciales de *M. alternifolia* y *E. globulus* pueden inhibir la formación de biopelículas de *Candida* en PMMA.<sup>12</sup>

**DamJaNoVić B et al (Montenegro, 2011)** La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* fue evaluada contra 17 microorganismos, incluyendo bacterias patógenas humanas y al hongo *Candida albicans*. Determinaron la actividad antimicrobiana por el método de disco difusión en agar. Utilizaron discos de papel filtro de 6mm impregnados con 5 concentraciones diferentes de aceite esencial de *E. globulus* (100%, 66,5%, 50%, 33,5% y 16,5%) y disco con 100µg de Nistatina. Los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana revelaron que el aceite esencial de *E. globulus* tiene una fuerte

actividad antimicrobiana, especialmente contra *Candida albicans*, observando un halo de inhibición de 46mm al 100% y 15mm al 16,5%.<sup>13</sup>

**Tyagi A et al (India, 2011)** Evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* frente a 14 microorganismos incluyendo al hongo *Candida albicans*, utilizando el método de agar/difusión en pozo. Evaluaron 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%). Realizaron 2 repeticiones de cada concentración. La zona de inhibición aumentó con la concentración creciente de aceite esencial de *E. globulus* en cada pocillo. La zona de inhibición para la concentración al 100%, alcanzó 34mm para *C. albicans*, mucho mayor que el alcanzaron para las bacterias estudiadas. Con ello, demostraron que el aceite esencial de *E. globulus* tiene potencial antimicrobiano, especialmente contra *C. albicans*.<sup>14</sup>

**Agarwal V. et al (India, 2010)** Evaluaron el efecto inhibidor de 30 aceites vegetales diferentes, incluyendo a *Eucalyptus globulus*, sobre *Candida albicans* aislado a partir de muestras clínicas. El agente antifúngico fluconazol se usó como control positivo. Los aceites vegetales se confrontaron con la levadura mediante el método de difusión con disco en medio sólido. Asimismo, se probaron en concentraciones de 0,03% a 3% (v/v) para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración fungicida mínima (MFC) usando dilución en agar y ensayos de macrodilución en caldo. Los resultados obtenidos muestran que, de los 30 aceites vegetales probados, el de mayor efectividad fue *E. globulus* con un halo de inhibición de 26,7 mm en promedio, para 5 repeticiones. La actividad antifúngica significativa de estos aceites sugiere que podrían servir como una fuente de compuestos con potencial terapéutico contra las infecciones relacionadas con *Candida*.<sup>15</sup>

**Musyimi D. (Kenya, 2008)**. Hicieron un estudio para establecer las propiedades antifúngicas del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y *E. citriodora* contra dos hongos filamentosos y la levadura *Candida albicans*, usando el método de difusión con disco en agar. Se realizó una dilución en serie del aceite esencial para determinar la concentración activa más baja en comparación con el 1% de clotrimazol. Los resultados indican que el aceite esencial de *E. globulus* al 100% fue muy eficaz obteniendo en promedio un halo de inhibición de 18 mm y no fue eficaz a baja concentración (12,5%) observando solo 6 mm. Concluyen que el aceite esencial de *E. globulus* indican tener algunas propiedades antifúngicas que podrían ser explotadas como fungicidas naturales.<sup>16</sup>

**Alzamora L. et al (Perú, 2001)**. Realizaron un estudio en donde el objetivo fue la investigación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú entre ellas *Eucalyptus globulus* Lábill

"eucalipto". Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron a bacterias grampositivas y gramnegativas y a *Candida albicans* ATCC 10231. Se hicieron 6 repeticiones para cada uno de las pruebas. Emplearon discos de antibióticos como controles. El aceite esencial de *E. globulus* mostró efecto inhibitorio sobre *C. albicans* con un promedio de halo de inhibición de 14 mm.<sup>7</sup>

### **Teorías relacionadas al tema:**

El término planta medicinal se refiere a una variedad de plantas que tienen propiedades medicinales. Las partes de las plantas medicinales que se pueden utilizar son las semillas, raíz, hoja, fruta, piel, flores o incluso toda la planta. Los compuestos activos en la mayoría de las partes de las plantas medicinales tienen efectos terapéuticos directos o indirectos y se usan como agentes medicinales. En el cuerpo de estas plantas, se producen y almacenan ciertos materiales que se conocen como compuestos activos (sustancias), que tienen efectos fisiológicos en los organismos vivos. Hoy en día, según la OMS, más del 80% de la población mundial confía más en las drogas tradicionales, principalmente plantas, que sirven como la principal fuente de atención de la salud.<sup>17</sup>

Las hierbas medicinales también se conocen como remedios herbales, productos a base de hierbas, medicamentos a base de hierbas, fitomedicamentos, agentes fitoterapéuticos y fitofármacos. El uso de hierbas medicinales en un enfoque basado en la evidencia o en la ciencia para el tratamiento y la prevención de la enfermedad se conoce como fitoterapia (racional). Este enfoque del uso de hierbas medicinales contrasta con la herboristería médica tradicional que utiliza hierbas medicinales de manera holística y principalmente sobre la base de sus usos empíricos y tradicionales. A pesar de la creciente popularidad de las hierbas medicinales en todo el mundo, hay una escasez de evidencia científica de eficacia para la mayoría de las hierbas medicinales. De hecho, muchas de las hierbas usadas medicinalmente en Europa tienen una reputación tradicional para sus usos, pero hay poca documentación científica de sus componentes activos, acciones farmacológicas o eficacia clínica.<sup>18</sup>

Las plantas medicinales tienen muchas características cuando se usan como tratamiento. Como Medicina sinérgica, todos los ingredientes de las plantas interactúan simultáneamente, de modo que sus usos pueden complementar o dañar a otros o neutralizar sus posibles efectos negativos. Como apoyo de la medicina oficial, en el tratamiento de casos complejos como las enfermedades del cáncer, los componentes de las plantas demostraron ser muy efectivos. Como Medicina preventiva, se ha demostrado que el componente de las plantas también se caracteriza por su capacidad para prevenir la aparición de algunas enfermedades. Esto

ayudará a reducir el uso de los remedios químicos que se usarán cuando la enfermedad ya está presente, es decir, reducir el efecto secundario del tratamiento sintético.<sup>19,20</sup>

Los microbiólogos clínicos tienen dos razones para estar interesados en el tema de los extractos de plantas antimicrobianas. En primer lugar, es muy probable que estos fitoquímicos encuentren su camino en el arsenal de medicamentos antimicrobianos recetados por los médicos; varios ya están siendo probados en humanos. En segundo lugar, el público se está volviendo cada vez más consciente de los problemas con la prescripción excesiva y el uso indebido de los antibióticos tradicionales. Además, muchas personas están interesadas en tener más autonomía sobre su atención médica. Una gran cantidad de compuestos de plantas (a menudo de una pureza no confiable) está disponible sin receta en proveedores de hierbas y tiendas de alimentos naturales, y la automedicación con estas sustancias es común.<sup>21</sup>

Los productos químicos funcionan en el cuerpo humano exactamente de la misma manera que los medicamentos farmacéuticos, por lo que los fitoquímicos de plantas medicinales funcionan de la misma manera. Se puede metabolizar en el cuerpo fácilmente sin efectos secundarios a un bajo costo. La presencia de fitoquímicos en partes enteras de todas las partes de las plantas, tienen diferentes tipos de metabolitos secundarios que son una buena fuente de compuestos activos antimicrobianos, antioxidantes y antidiabéticos conocidos son 12,000 en la ciencia de las plantas. El eucalipto posee características medicinales versátiles, que tienen propiedades similares a muchos fármacos. El eucalipto es un árbol de hoja perenne, nativo de Australia y se encuentra en muchos países. El género *Eucalyptus* contiene alrededor de 600 especies. El árbol puede crecer 125-160 metros; Los aborígenes (nativos australianos) han usado tradicionalmente hojas de eucalipto para curar heridas e infecciones fúngicas.<sup>22</sup>

Los reportes de estudios de varios países indican que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* presenta más de 50 compuestos químicos. Los componentes principales son 1,8-cineol,  $\alpha$ -Pinene, acetato de  $\alpha$ -terpineol y alloaromadendreno. Asimismo, presenta 1,8-eucalyptol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalool,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -eudesmol, (-) - globulol y epiglobulol.<sup>23,24,25</sup>

El aceite esencial extraído de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill es una fuente rica de medicinas tradicionales con una variedad de actividades biológicas. Es ampliamente utilizado para tratar la tuberculosis pulmonar, la diabetes, el asma y también se utiliza como desinfectante, agente antioxidante y agente antiséptico, especialmente en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio superior y ciertas enfermedades de la piel. Los

aborígenes (nativos australianos) han usado tradicionalmente hojas de eucalipto para curar heridas e infecciones fúngicas.<sup>22,25</sup>

El aceite esencial de *E. globulus* ejerce acción antimicótica contra dermatofitos y levaduras como *Cándida albicans*. Los compuestos antifúngicos pueden dirigirse a diversas estructuras celulares o vías químicas, tales como degradación de la pared celular, daño a la membrana, disipación de la fuerza motriz del protón, disminución de la actividad proteasa extracelular, contenido de o-lipopolisacárido ramnosa, contenido de ergosterol o ácidos grasos insaturados. Sin embargo, los datos de investigación son muy limitados sobre el mecanismo de actividad antifúngica de los aceites de eucalipto.<sup>26</sup>

*Candida albicans* es un patógeno fúngico oportunista que existe como comensal inofensivo en los tractos gastrointestinal y genitourinario en aproximadamente el 70% de los seres humanos y aproximadamente el 75% de las mujeres sufren de infección por *Candida* al menos una vez en su vida. La patogenicidad de *C. albicans* depende de dos factores principales. Uno es el estado inmune del huésped y otro está relacionado con los factores de virulencia de este patógeno<sup>27</sup>. Entre los factores que contribuyen al potencial patogénico de *C. albicans* está la producción de adhesinas e invasinas, que median la adhesión e invasión de las células huésped, la secreción de enzimas hidrolíticas, la transición de levadura a hifa, detección de contacto y tigmotropismo, formación de biopelícula, cambio fenotípico y adaptabilidad metabólica.<sup>28</sup>

*C. albicans* existe como levadura, pseudohifas e hifas, todas las cuales son importantes para la virulencia. Las células de levadura son esenciales para la diseminación, mientras que las formas de hifas pueden ser esenciales para invadir las superficies de la mucosa. El cambio de morfología entre la levadura en ciernes y el crecimiento de las hifas se desencadena por diversas señales ambientales del huésped, que incluyen la temperatura, el pH, el suero y el CO<sub>2</sub>.<sup>29</sup>

Debido al aumento de la resistencia a los antimicóticos de *C. albicans* y la mortalidad del 25-60% de los pacientes con candidemia, existe un interés creciente en el uso de productos naturales derivados de plantas medicinales como agentes antifúngicos. Los aceites esenciales (AE) ya han encontrado una gama considerable de aplicaciones debido a su amplio espectro de actividades, menos efectos secundarios, menor toxicidad si se usan de manera apropiada. Sin embargo, su uso en la terapia puede ser limitado debido a reacciones alérgicas. La toxicidad de los aceites esenciales depende claramente de su concentración, composición y vía de administración, y las reacciones adversas se pueden evitar mediante el uso de concentraciones más bajas de AE.<sup>28</sup>



## **I. INTRODUCCION**

### **1.1. Problema**

¿Tiene efecto antimicótico el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en comparación con el Fluconazol a 25µg, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, en un estudio in vitro?

#### **Se realizó la siguiente justificación de la investigación**

Es sabido que, desde tiempos inmemorables, las plantas son utilizadas como medicina natural, alternativa y/o complementaria, frente a una gran diversidad de enfermedades infecciosas y no infecciosas, en casi todas las regiones del mundo; a pesar que, en muchos casos reportados, no tienen fundamentación ni sustento científico. Perú no es ajeno a esto, por ello, surge la necesidad de realizar estudios basados en el método científico, que den soporte a estas prácticas fitoterapéuticas, enraizadas en las culturas de la población mundial. Las plantas consideradas como medicinales, poseen componentes fitoquímicos en sus raíces, tallos, hojas, flores y frutos con propiedades benéficas para la salud humana. Una de las propiedades que se le atribuyen a un grupo de plantas es la de presentar actividad antimicótica. Lo cual, será considerado en el presente estudio in vitro para ampliar los conocimientos ya reportados en diversas revistas y Journals de varios países.

En el presente trabajo de investigación se obtendrá información sobre las propiedades antifúngicas de los componentes activos que tiene el aceite esencial de *Eucalyptus globulus*; con lo cual, se aportará conocimientos importantes y relevantes para ser considerado en el tratamiento de las micosis por *Candida albicans*. Se debe aclarar, que no se pretende sustituir al tratamiento farmacológico convencional, a pesar del efecto que pueda tener y darse en los resultados de este estudio.

Se eligió este vegetal para observar cómo se comporta como antimicótico, ya que en nuestro medio no existen reportes relacionados con estos elementos de estudio. La prueba de susceptibilidad anti fúngica se hará utilizando el método de disco difusión en agar, considerando los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), a través de su Estándar M44-A2.

Es pertinente la realización de este estudio, porque pretende aportar una alternativa para el tratamiento de micosis por *C. albicans*, ya que se conoce del uso sin prescripción médica y casi sin control de antimicóticos en nuestro medio, y la consecuente resistencia microbiana que cada día va en aumento. A pesar que esta investigación tendrá algunas limitaciones, se

realizará siguiendo minuciosamente el método científico; por ello, los resultados observados tendrán validez científica.

## **1.2. Hipótesis**

H1: El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* tiene efecto antimicótico en comparación con Fluconazol a 25 µg, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, en un estudio in vitro.

H0: El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* no tiene efecto antimicótico en comparación con Fluconazol a 25 µg, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, en un estudio in vitro.

## **1.3. Objetivos:**

### **General**

Evaluar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con Fluconazol a 25µg, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, en un estudio in vitro.

### **Específicos:**

- Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a concentración de 100%.
- Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a concentración de 75%.
- Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a concentración de 50%.
- Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a concentración de 25%.
- Determinar el efecto antimicótico del Fluconazol a 25 µg.

## II. MARCO MÉTODOLOGICO

### 2.1. Variables:

#### 2.1.1 Variable independiente: Agente antimicótico

- **Agente antimicótico no farmacológico:** Aceite esencial de *Eucalyptus globulus*.
- **Agente antimicótico farmacológico:** Fluconazol 25µg.

#### 2.1.2 Variable dependiente: Efecto antimicótico

- **Eficaz:** zona de inhibición mayor que agente farmacológico.
- **No eficaz:** zona de inhibición menor que agente farmacológico.

### 2.2 Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antimicótico	Para el tratamiento de <i>Candida albicans</i> se utilizó: Tratamiento no farmacológico con <i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto”. <sup>30</sup> Tratamiento farmacológico con Fluconazol. <sup>31</sup>	La población fue dividida en los siguientes grupos: 100% 75% 50% 25% Fluconazol Solución salina	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antimicótico	Acción ejercida por un agente físico, químico o biológico sobre los hongos, eliminándolos (fungicida) o inhibiéndolos (fungistático). <sup>32</sup>	Se midió la zona de inhibición de crecimiento, considerando los criterios del Estándar M60 del CLSI <sup>33</sup> : Sensible ≥17mm Intermedio 14-16mm Resistente ≤13mm	Eficaz ≥17 mm  No eficaz <17 mm	Cualitativa nominal

## 2.4 Tipos de estudio: Básico

## 2.5. Diseño: Experimental con post prueba y repeticiones múltiples

Se consideró el esquema siguiente:

RG <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
RG <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
RG <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
RG <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
RG <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
RG <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>

En donde:

RG<sub>1-6</sub>: Grupos de cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

X<sub>1</sub>: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 100%

X<sub>2</sub>: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 75%

X<sub>3</sub>: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 50%

X<sub>4</sub>: Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 25%

X<sub>5</sub>: Control negativo (Suero fisiológico, DMSO)

X<sub>6</sub>: Control positivo (Fluconazol 25µg)

O<sub>1-6</sub>: Efecto antimicótico (halo de inhibición).

## 2.6. Población, muestra y muestreo

### Población:

Estuvo constituida por todos los cultivos con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 del laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

### Muestra:

### Tamaño muestral:

La selección de la muestra se hizo considerando la fórmula estadística para comparación de dos promedios y estimación de la diferencia que existe entre ellas. (Anexo 1)

### Muestreo:

Se aplicó un muestreo aleatorio simple de cada grupo de cepas cultivadas.

**Criterios de selección:****Criterios de inclusión:**

- Todas las cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 con 24 horas de cultivadas.

**Criterios de exclusión:**

- Cultivos de cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 contaminadas.

**2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad**

**La técnica:** Se hizo la observación directa del crecimiento de las cepas cultivadas en cada placa Petri.

**Procedimiento:** Se procedió de acuerdo a los pasos siguientes:

- a) Se realizó la identificación taxonómica de *Eucalyptus globulus* “eucalipto” en el Herbario Antenor Orrego – HAO de Trujillo, Perú. (Anexo 2)
- b) Se obtuvo el Aceite Esencial de *Eucalyptus globulus* mediante la técnica de arrastre de vapor de agua<sup>34</sup>. (Anexo 3)
- c) La levadura *Candida albicans* ATCC 10231 se cultivó en el medio de agar Sabouraud Glucosado<sup>35</sup>. (Anexo 4)
- d) La susceptibilidad del patógeno se midió con el método de disco difusión en agar, según lo establecido por el Estándar M44-A2 del CLSI.<sup>36</sup> (Anexo 5)

**Instrumento:**

Se utilizó una ficha de recolección de datos que fue elaborada con los criterios del CLSI, se consignaron el número de placas, las diluciones y los halos de inhibición (Anexo 6).

**Validación y confiabilidad del instrumento:**

La ficha de recolección de datos fue elaborada por el investigador donde tenía el número de repetición y los halos de inhibición por cada dilución y cepa cultivada, la cual fue validada por opinión de tres expertos en Microbiología.

**2.8. Métodos de análisis de datos**

Los datos obtenidos en los resultados fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2013 y se sometieron a pruebas estadísticas en el Software estadístico SPSS VS. 25 para Windows. Se consideró las pruebas estadísticas de análisis de varianza (ANOVA), HSD Tukey.

Asimismo, se graficó utilizando el Diagrama de Cajas y bigotes para comparar el efecto del aceite esencial.

## **2.9. Aspectos éticos:**

El estudio se realizó respetando los criterios de bioseguridad en el laboratorio con las personas y con el medio ambiente. Se consideró los protocolos de tratamiento de material potencialmente infeccioso y no exposición al peligro de las personas, según el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS<sup>37</sup>.

### III. RESULTADOS

**TABLA 1.** Efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* ATCC 10231 en diferentes concentraciones:

#### DATOS DESCRIPTIVOS

Diluciones	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
25	10	5,90	4,122	1,303	2,95	8,85	0	9
50	10	12,20	,789	,249	11,64	12,76	11	13
75	10	16,20	,789	,249	15,64	16,76	15	17
100	10	18,00	1,414	,447	16,99	19,01	15	19
Fluconazol	10	22,20	1,135	,359	21,39	23,01	21	24
Total	50	14,90	5,929	,838	13,21	16,59	0	24

Fuente: Ficha de recolección de datos

**TABLA 2:** Análisis Multivariado de la Comparación del efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231

ANOVA					
Fuente de variacion	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	<b>1,529</b>	<b>4</b>	382	89	0.000
Dentro de grupos	<b>194</b>	<b>45</b>	4		
Total	1,723	49			
Fuente: Tabla 1					

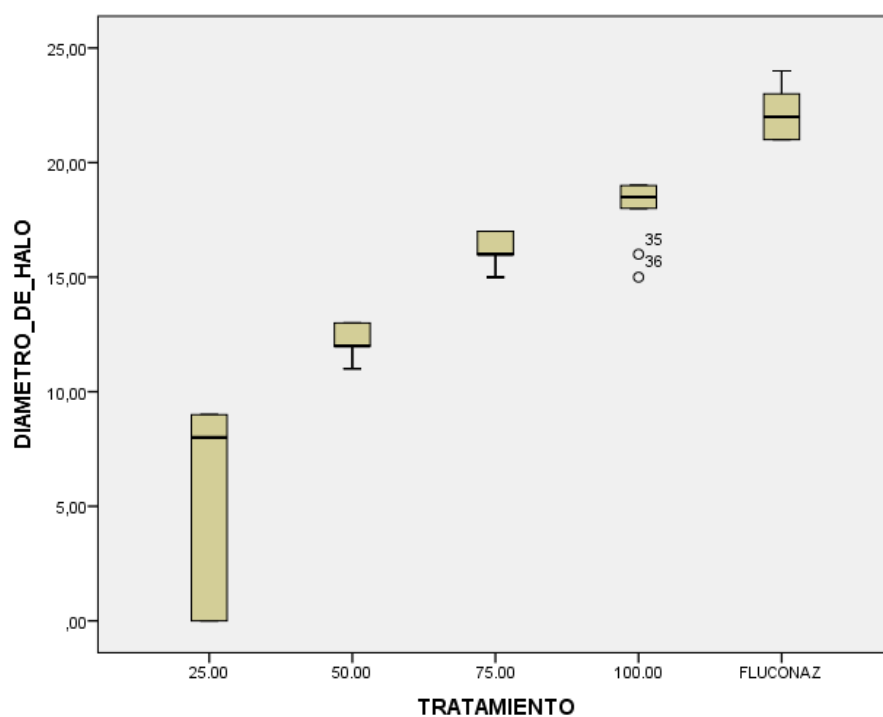


**TABLA 3:** Análisis Post Anova de Tukey del efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

HSD Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25%	10	5.9			
50%	10		12.2		
75%	10			16.2	
100%	10			18.2	
Fluconazole	10				22.2
Sig.		1.00	1.00	0.31	1.00

Fuente: Tabla 1



FUENTE: Tabla 1

**GRÁFICO 1:** Comparación del Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a diferentes soluciones y fluconazol, sobre *Candida albicans* ATCC 10231

#### IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%) sobre *Candida albicans* ATCC 10231, comparado con fluconazol a 25µg; se realizó un estudio in vitro, obteniéndose los siguientes resultados.

El mayor diámetro de halo inhibitorio (Tabla 1), fue a la concentración de 100% del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (18 mm), considerándose sensible según los criterios del CLSI ( $\geq 17$ ), DE:  $1.414 \pm 0.447$  IC95% [16.99-19.01]. Los diámetros de los halos de inhibición para las concentraciones de 75, 50 y 25% fueron menores, considerándose resistente. La información es estadísticamente significativa como se observa en la tabla 02, el análisis de varianzas ANOVA evidencia una  $p=0.0000$  indicando que los resultados son altamente significativos; y en la prueba de homogeneidad Post ANOVA de Tukey, evidencia que las concentraciones al 100% del aceite *Eucalyptus globulus* tienen efecto antimicótico (Tabla 3), y en el gráfico de bigotes, se visualiza mejor que a mayor concentración del aceite *Eucalyptus globulus* el efecto antimicótico aumenta, sin embargo, no supera al tratamiento estándar (fluconazol) (20mm).

Los resultados encontrados en este estudio son semejantes a los de Echevarría<sup>10</sup> (17 mm), Nidhi et al<sup>8</sup> (17 mm) y Emira et al<sup>12</sup> (17.66 mm), considerando que si existe efecto antimicótico. Sin embargo, otros estudios reportan mayor efecto antimicótico del aceite esencial de eucalipto contra *Candida albicans*; como el estudio de Agarwal et al<sup>15</sup> quienes observaron zonas de inhibición de 26,7mm de diámetro, Tyagi et al<sup>14</sup> (34mm), DamJaNoVić et al<sup>13</sup> (46 mm), Mota et al<sup>11</sup> (50mm) y Tolba et al<sup>9</sup> observaron halos de hasta  $55 \pm 2,82$  mm de diámetro.

Los reportes de estudios de varios países indican que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* presenta más de 50 compuestos químicos. Los componentes principales son 1,8-cineol,  $\alpha$ -Pinene, acetato de  $\alpha$ -terpineol y alloaromadendreno, los cuales producen alteraciones en componentes moleculares de la membrana citoplasmática causando inestabilidad y destrucción de la membrana celular. Asimismo, presenta 1,8-eucalyptol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalool,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -eudesmol, (-) - globulol y epiglobulol, los cuales también alteran componentes de la membrana citoplasmática.<sup>23,24,25</sup> Los compuestos antifúngicos pueden dirigirse a diversas estructuras celulares o vías químicas, tales como degradación de la pared celular, daño a la membrana, disipación de la

fuerza motriz del protón, disminución de la actividad proteasa extracelular, contenido de o-lipopolisacárido ramnosa, contenido de ergosterol o ácidos grasos insaturados.<sup>26</sup>

Todos estos estudios mencionados, fueron realizados en otros países donde utilizaron muestras de hojas de *Eucalyptus globulus* de su región, la diferencia en los resultados de nuestro estudio y los demás estudios, se debe probablemente a la variabilidad en la cantidad de los componentes activos de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* procedentes de diferentes zonas geográficas. Muchos trabajos de investigación confirman que los fitoquímicos de los aceites esenciales de eucalipto, están en cantidades diferentes, por la influencia de algunos factores, tales como humedad relativa, edad de la planta, tipo de suelo de cultivo, latitud y altitud, entre otros.<sup>38,39,40</sup>

En Trujillo, Perú se reporta un estudio realizado por Durango<sup>41</sup> quien evaluó el efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* se evaluó mediante la medición de la zona de inhibición, la cual alcanzó 8,9mm de diámetro, mucho menor que el valor encontrado en el presente estudio, donde se eligieron plantas de la ciudad de Otuzco, ubicada en la sierra del departamento de la libertad, de donde se recolectó las hojas más verdes en estación de otoño, de plantas de aproximadamente 3 años de edad cultivadas a una altitud media de 2641 m.s.n.m., con una humedad al 58% . Confirmando que puede variar los resultados, aún, siendo del mismo lugar las muestras vegetales. Lo cual, podría estar influenciado por factores procedimentales entre otros.<sup>38</sup>

Por otra parte, el diámetro del halo de inhibición del fluconazol fue de 22.2 mm. DE:1.13 mm (Tabla 2), muy similar a lo observado por Nidhi et al<sup>8</sup>, quienes reportan zonas de inhibición de  $22 \pm 0,5$  mm. Pero difiere del estudio de Echevarría<sup>10</sup> y de Durango<sup>41</sup>, quienes observaron la formación de zonas de inhibición de 10 mm y 39,4 mm respectivamente. Esta diferencia estaría relacionada a factores intervinientes como capacidades procedimentales, tipo de cepa de *Candida albicans* o materiales utilizados diversos.

El análisis con la prueba estadística de ANOVA (Tabla 3), compara las diferentes concentraciones de *Eucalyptus globulus* y fluconazol, indica que existe diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) en por lo menos dos de las cuatro concentraciones de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (100%, 75%, 50% y 25%) y el fluconazol (grupos estudiados); lo cual fue pertinente realizar un análisis pos anova para determinar el mejor tratamiento.

El análisis PosHoc HSD Tukey (Tabla 4) indica que existe cuatro grupos con diferente efecto y que existe una diferencia significativa entre el diámetro de fluconazol (22.2mm) y la

concentración del *Eucalyptus globulus* al 100% y de 75% (18.2 y 16.2 mm) respectivamente por tener el diámetro medio más alto de halo de inhibición considerándose el 100% y 75% el segundo más eficaz. Mientras que las concentraciones de 50 y 25% son mínimas en términos de eficacia.

## V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 100% es eficaz como antimicótico sin embargo no supera el halo de inhibición de fluconazol.
- El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 75%, 50% y 25% presentaro halos de inhibición pero no fueron considerados como eficaces como antimicótico contra *Candida albicans* ATCC 10231, según los criterios del CLSI ( $\geq 17\text{mm}$ ).
- El fluconazol a la concentración de 25 $\mu\text{g}$ , es más eficaz como antimicótico contra *Candida albicans* ATCC 10231.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios en extracto etanólico, metanólico y acuoso de las hojas de edades diferentes de *Eucalyptus globulus*, considerando los factores que pueden afectar la actividad antimicótica, tales como aquellos intrínsecos de la planta como extrínsecos o ambientales.
- Se recomienda evaluar el efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* mediante el método de macro y microdilución, para establecer la concentración inhibitoria mínima y concentración fungicida mínima de *Eucalyptus globulus* necesaria para la inhibición o eliminación de *Candida albicans*.
- Se recomienda evaluar *in vivo* el efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes, en modelos animales.

## VII. REFERENCIAS

1. Cannoni G, Bórquez S. Vulvovaginitis e infecciones de transmisión sexual en la adolescencia. Rev. Med. Clin. Condes. 2011 22(1): 49-57. [Citado: 29 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/pt-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-vulvovaginitis-e-infecciones-transmision-sexual-S0716864011703923>
2. Pineda J, Cortés AA, Uribarren T, Castañón LR. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev. Méd. Risaralda 2017 23(1): 38-44. [Citado: 2 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>
3. Moreno M, Moreno O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. Acta Med Peru. 2017 34(4): 289-93 [Citado: 9 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v34n4/a06v34n4.pdf>
4. Béjar B, Villanueva F, Guevara JM, González S, Vergaray G, Abanto E, Napán K, Velásquez L, Vergaray S. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. An Fac med. 2014 75(2): 167-72 [Citado: 5 de julio de 2018]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/8380/7492>
5. Tapia DI. Candidiasis oral: Aspectos clínicos y diagnóstico [Tesis para Título profesional]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2011 [Citado: 13 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/DIANAISABELTAPIARENGIFO.pdf>
6. Organización de Estados Iberoamericanos. Medicina Tradicional y Moderna: hechos y cifras. Reportaje. Marzo 2011 [Citado: 22 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/reportajes100.htm>
7. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. An Fac med. 2001 62(2): 156-61 [Citado: 1 de junio de 2018]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/4167/3324>
8. Nidhi p, Kumari R, Thakur S, Devi R, Sharma R, Kashyap S, Dev K, Sourirajan A. Role of Essential Oils of Medicinal Plants (*Eucalyptus Globulus*, *Thuja Occidentalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Lavandula Officinalis*) to Treat Broad Spectrum Bacterial and Fungal Pathogens and as Antioxidants in Food and Health. International Conference on New Horizons in Green Chemistry & Technology (ICGCT). Dehradun, India; 27-28 de noviembre de 2018: 21 pp. [Citado: 2 de marzo de 2019]. Disponible en:



[https://www.researchgate.net/publication/329930366\\_Role\\_of\\_Essential\\_Oils\\_of\\_Medicinal\\_Plants\\_Eucalyptus\\_Globulus\\_Thuja\\_Occidentalis\\_Rosmarinus\\_Officinalis\\_Lavandula\\_Officinalis\\_to\\_Treat\\_Broad\\_Spectrum\\_Bacterial\\_and\\_Fungal\\_Pathogens\\_and\\_as\\_Antioxidant](https://www.researchgate.net/publication/329930366_Role_of_Essential_Oils_of_Medicinal_Plants_Eucalyptus_Globulus_Thuja_Occidentalis_Rosmarinus_Officinalis_Lavandula_Officinalis_to_Treat_Broad_Spectrum_Bacterial_and_Fungal_Pathogens_and_as_Antioxidant)

9. Tolba H, Moghrani H, Aboun A, Maachi R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Agronomic and Biological Sciences*. 2018; 18: 19-27. [Citado: 9 de marzo de 2019]. Disponible en: [https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/issue-18/Article\\_B/Article\\_462.pdf](https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/issue-18/Article_B/Article_462.pdf)
10. Echevarría AE. Actividad anti fúngica “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de eucalipto “*Eucalyptus globulus*” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231 [Tesis para Título profesional]. Riobamba, Ecuador: Universidad Nacional de Chimborazo; 2017 [Citado: 30 de junio de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4454/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2017-0034.pdf>
11. Mota VS, Turrini RNT, Poveda VB. Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study. *Rev Esc Enferm USP*. 2015 49(2): 215-219 [Citado: 29 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v49n2/0080-6234-reeusp-49-02-0216.pdf>
12. Emira N, Mejdi S, Aouni M. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils on oral *Candida* biofilm formation on polymethylmethacrylate. *J. Med. Plants Res*. May 2013; 7(20): 1461-1466. [Citado: 14 de abril de 2019]. Disponible en: [http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380725789\\_Emira%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380725789_Emira%20et%20al.pdf)
13. DamJaNoVić B, ĐakoV T, ŠukoVić D, DamJaNoVić J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J. Food Sci*. 2011 19(3): 277-284 [Citado: 20 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/39925.pdf>
14. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. May 2011 126(1): 228-235 [Citado: 9 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.academia.edu/22128240/Antimicrobial\\_potential\\_and\\_chemical\\_composition\\_of\\_Eucalyptus\\_globulus\\_oil\\_in\\_liquid\\_and\\_vapour\\_phase\\_against\\_food\\_spoilage\\_microorganisms?auto=download](https://www.academia.edu/22128240/Antimicrobial_potential_and_chemical_composition_of_Eucalyptus_globulus_oil_in_liquid_and_vapour_phase_against_food_spoilage_microorganisms?auto=download)
15. Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 43(5): 447–451 [Citado: 9 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.e-jmii.com/article/S1684-1182\(10\)60069-2/pdf](https://www.e-jmii.com/article/S1684-1182(10)60069-2/pdf)

16. Musyimi DM, Ogur JA. Comparative Assessment of Antifungal Activity of Extracts from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus citriodora*. Res. J. Phytochem. 2008 2(1): 35-43 [Citado: 11 de junio de 2018]. Disponible en:  
<http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/rjphyto/2008/35-43.pdf>
17. Jamshidi F, Lorigooini Z y Amini . Medicinal plants: Past history and future perspective. J Herbmed Pharmacol. 2018 7(1): 1-7 [Citado: 14 de junio de 2018]. Disponible en:  
<http://www.herbmedpharmacol.com/PDF/jhp-7-1.pdf?t=636695352413636178>
18. Barnes J, Anderson LA y Phillipson JD. Herbal Medicines. 3ra edición. Londres: Pharmaceutical Press; 2007 [Citado: 18 de junio de 2018]. Disponible en:  
<http://file.zums.ac.ir/ebook/366-Herbal%20Medicines,%20Third%20edition-Joanne%20Barnes%20J.%20David%20Phillipson%20Linda%20A.%20Anderson-085369623.pdf>
19. Rasool BA. Medicinal Plants (Importance and uses). Pharmaceut Anal Acta. 2012 3(10). [Citado: 17 de julio de 2018]. Disponible en:  
<https://www.omicsonline.org/medicinal-plants-importance-and-uses-2153-2435.1000e139.pdf>
20. Motaleb MA, Hossain MK, Sobhan I, Alam MK, Khan NA y Firoz R. Selected Medicinal Plants of Chittagong Hill Tracts. Bangladesh: IUCN (International Union for Conservation of Nature); 2011 [Citado: 20 de julio de 2018]. Disponible en:  
[https://www.iucn.org/sites/dev/files/import/downloads/medicinal\\_plant\\_11\\_book.pdf](https://www.iucn.org/sites/dev/files/import/downloads/medicinal_plant_11_book.pdf)
21. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999 12(4): 564–582 [Citado: 23 de julio de 2018]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/pdf/cm000564.pdf>
22. Dwivedi N, Tiwari A, Singh R y Tripathi IP. Evaluation of Plant Secondary Metabolites Composition and Antimicrobial Activities of *Eucalyptus globulus* Extracts. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2018 Special Issue-7: 4517-4527 [Citado: 13 de julio de 2018]. Disponible en:  
<https://www.ijcmas.com/special/7/Namrata%20Dwivedi,%20et%20al.pdf>
23. Abdossi V, Moghaddam EY y Hadipanah A. Chemical Composition of *Eucalyptus globulus* grown in Iran. An International Journal. 2015 7(2): 322-324 [Citado: 22 de julio de 2018]. Disponible en:  
<https://www.researchtrend.net/bfij/pdf/52%20ELAHEH%20YAGHOOTI%20MOGHADDA M.pdf>
24. Karamian R, Mohammadian A, Hassanimoghaddam E et al. Identification and comparison of the yield and composition of essential oil constituents of four *Eucalyptus* species adapted to

- the climatic conditions of Khorramabad. J HerbMed Pharmacol. 2015 4(1): 25-28 [Citado: 2 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.herbmedpharmacol.com/PDF/JHP-4-25.pdf>
25. Song A, Wang Y y Liu Y. Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China. Asian Journal of Traditional Medicines. 2009 4(4): 134-140 [Citado: 25 de julio de 2018]. Disponible en: [http://jonnsaromatherapy.com/pdf/GC-MS\\_Eucalyptus\\_globulus\\_2009\\_01.pdf](http://jonnsaromatherapy.com/pdf/GC-MS_Eucalyptus_globulus_2009_01.pdf)
  26. Zhang J, An M, Wu H, Stanton R y Lemerle D. Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils. Allelopathy Journal. 2010 25(2): 313-330 [Citado: 28 de julio de 2018]. Disponible en: <https://researchoutput.csu.edu.au/ws/portalfiles/portal/8780096/Zhang%20et%20al%202010.pdf>
  27. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. ISRN Microbiology. 2012 2012: 21-15 [Citado: 7 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/538694/>
  28. Rajkowska K, Otlewska A, Kunicka A y Krajewska A. *Candida albicans* Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory Concentrations. Int. J. Mol. Sci. 2017 18(6): pii 1307 [Citado: 20 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486128/pdf/ijms-18-01307.pdf>
  29. Li Z y Nielsen K. Morphology Changes in Human Fungal Pathogens upon Interaction with the Host. J. Fungi. 2017 3(4): 66 [Citado: 19 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/66>
  30. Bokaeian M, Nakhaee A, Moodi B y Ali Khazaei H. *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus) Treatment of Candidiasis in Normal and Diabetic Rats. Iran. Biomed. J. July 2010 14(3): 121-126 [Citado: 23 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3904063/pdf/ibj-14-121.pdf>
  31. Barberán J, Mensa J, Fariñas C et al. Recomendaciones de tratamiento antifúngico en pacientes con bajo grado de inmunodepresión. Rev Esp Quimioter 2008 21(2): 127-142 [Citado: 20 de julio de 2018]. Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/21/2/consensobarbera.pdf>
  32. Ryan KJ y Ray CG. Microbiología Médica de Sherris. 5ta. Edición. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.; 2011.
  33. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI Supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
  34. Peredo HA, Palou E y López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009 3(1): 24-32 [Citado: 8 de julio de 2018]. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

35. Britania Lab. Sabouraud Glucosado Agar. Argentina: Laboratorios Britania S.A.; 2015 [Citado: 11 de julio de 2018]. Disponible en:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2971216486e.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2971216486e.pdf)
36. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2st ed. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
37. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005 [Citado: 20 de julio de 2018]. Disponible en:  
[http://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf)
38. Harkat L, Asma B, Madani K, Bey Z, Rigou P, Grenier D et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. Industrial Crops and Products. 2015; 78: 148–153. [Citado: 12 de marzo de 2019]. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/18649769/Chemical\\_composition\\_antibacterial\\_and\\_antioxidant\\_activities\\_of\\_essential\\_oil\\_of\\_Eucalyptus\\_globulus\\_from\\_Algeria](https://www.academia.edu/18649769/Chemical_composition_antibacterial_and_antioxidant_activities_of_essential_oil_of_Eucalyptus_globulus_from_Algeria)
39. Bachheti RK. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Eucalyptus Globulus* collected from Haramaya University, Ethiopia. Der Pharma Chemica. 2015; 7(2): 209-214. [Citado: 15 de marzo de 2019]. Disponible en:  
<https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemica/chemical-composition-and-antibacterial-activity-of-the-essential-oil-from-the-leaves-of-eucalyptus-globulus-collected-fr.pdf>
40. Joshi A, Sharma A, Bachheti RK, Pandey DP. A Comparative Study of the Chemical Composition of the Essential oil from *Eucalyptus globulus* Growing in Dehradun (india) and Around the World. Orient. J. Chem. 2016; 32(1): 331-340. [Citado: 29 de abril de 2019]. Disponible en:  
[http://www.orientjchem.org/pdf/vol32no1/OJC\\_Vol32\\_No1\\_p\\_331-340.pdf](http://www.orientjchem.org/pdf/vol32no1/OJC_Vol32_No1_p_331-340.pdf)
41. Durango OK. Comparación del efecto in vitro de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Candida albicans* aislada de paciente con candidiasis vulvovaginal. [Tesis de título]. Trujillo, Perú: Universidad Privada Antenor Orrego; 2018. [Citado: 8 de abril de 2019]. Disponible en:  
[http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/4757/1/RE\\_MED.HUMA\\_OLGA.DURANGO\\_COMPARACION.EFECTO.INVITRO\\_DATOS.pdf](http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/4757/1/RE_MED.HUMA_OLGA.DURANGO_COMPARACION.EFECTO.INVITRO_DATOS.pdf)

## ANEXOS

### Anexo 1

#### TAMAÑO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1,96$  Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0,84$  para una potencia de prueba del 80%
- $\bar{X}_1 = 15^{10}$
- $\bar{X}_2 = 17^{30}$
- $\sigma^2 = 1,53^8$

$$n = 5,9976 = 6 \text{ repeticiones}$$

Finalmente, durante el proceso de ejecución, se consideró 10 repeticiones por cada concentración.

## Anexo 2

### IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Eucalyptus globulus*



**UPAO**

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 70-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

### CONSTANCIA

Que **Marconi Alomia Dionicio Ramos**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

*Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* comparado con fluconazol, sobre *Candida albicans* ATCC 10231, estudio *in vitro*".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 14 de diciembre de 2018



**Mg. Segundo Leiva González**

Director

Museo de Historia Natural y Cultural



### Anexo 3

## ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO

### Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Eucalyptus globulus* “eucalipto” se colectaron en la ciudad de Otuzco, Región La Libertad, Perú, en una cantidad de 8 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservaron almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



### Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un



ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. Así, el balón con

agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por un decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, y quedó el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 4 horas aproximadamente. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual, se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.





## **Anexo 4**

### **MEDIO DE CULTIVO**

#### **Preparación del medio de cultivo**

Se utilizó agar Sabouraud como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que se solidificó completamente.



## Anexo 5

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

#### Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M44-A2 y M60.

##### a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Candida albicans*, cultivado hace 24 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).



##### b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Candida albicans*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizó sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

##### c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750  $\mu$ L de AE y 250  $\mu$ L de DMSO al tubo de 75%, 500  $\mu$ L de AE y 500  $\mu$ L de DMSO al tubo de 50%, y 250  $\mu$ L de AE y 750  $\mu$ L de DMSO al tubo de 25%.



d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de AE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de AE al 50% en otro disco, 10 µL de AE al 75% en otro disco y 10 µL de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.



e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

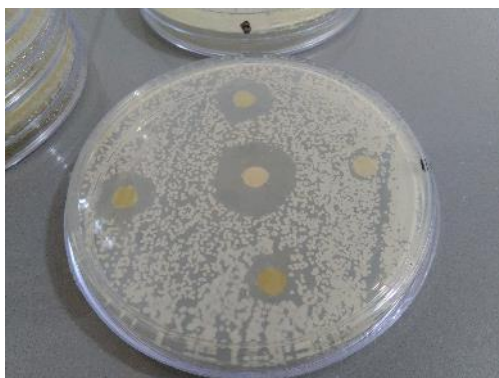
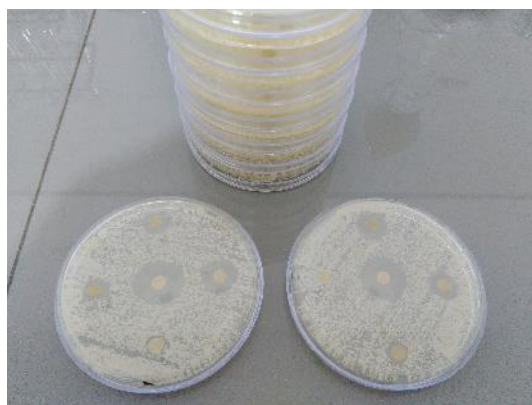
Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Candida albicans*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Fluconazol

25µg (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 48 horas.



f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Eucalyptus globulus* y para el Fluconazol. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M60 del CLSI.

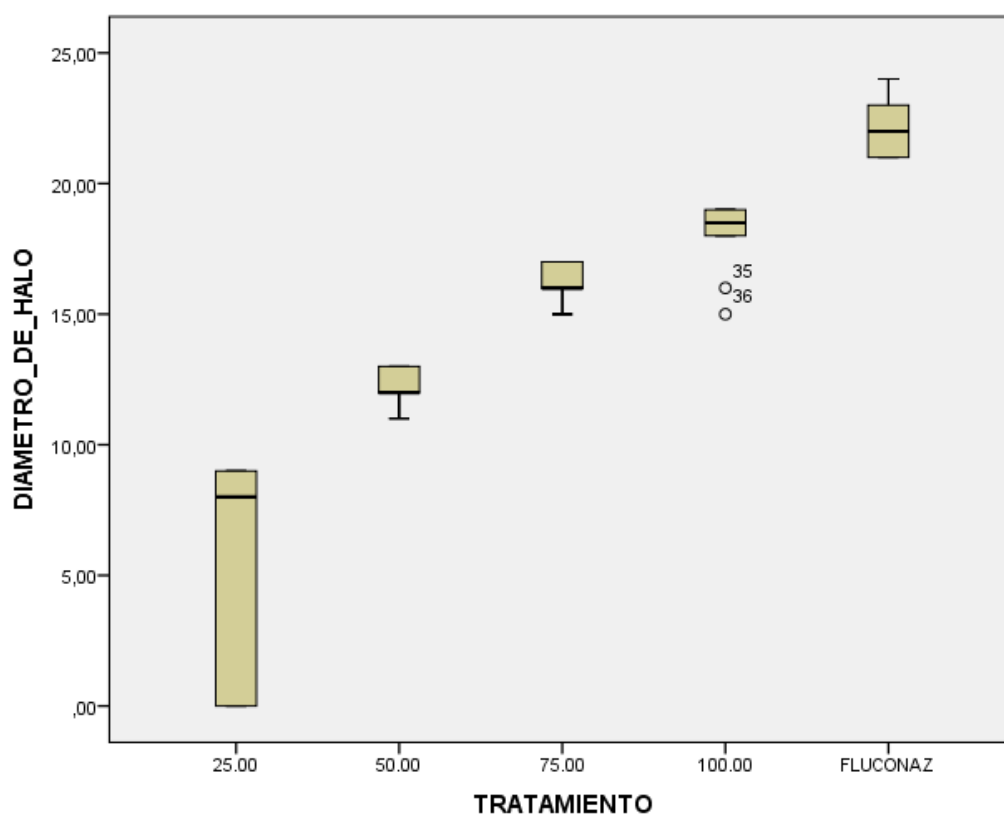


## Anexo 6

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de <i>E. globulus</i>				Fluconazol	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

## Anexo 7



**FIGURA 1:** Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231